PROCEDURA OPERATIONALA

CONTROLUL CONDIŢIILOR DE MEDIU

COD: PO –M-05

Editia 1, Revizia 0

APROBAT,
Sef laborator,

Data:
23.11.2010

VERIFICAT:
Sef compartiment,

ELABORAT,

Exemplar nr:

CONTROLAT ☐ NECONTROLAT ☐

Acest document este proprietatea intelectuala a LABORATORULUI DE ANALIZE MEDICALE a …. iar difuzarea sau multiplicarea sa nu poate fi facuta decat cu acordul acestuia.

INDICATORUL EDIŢIILOR ŞI REVIZIILOR

Revizia: Data aplicării:	Nr. capitol revizuit	Continutul modificarii	Nume, prenume şi semnătura		
			Elaborat	Verificat	Aprobat

CUPRINS

1	**Scop**
2	**Domeniu de aplicare**
3	**Documente de referinţă**
4	**Termeni si Definiţii. Abrevieri**
5	**Descriere procedura**
6	**Responsabilitati**
7	**Inregistrari**
8	**Anexe**

1. SCOP

Instrucţiunea descrie modul in care se efectueaza controlul microbiologic al conditiilor igienico-sanitare (aeromicroflora si controlul suprafetelor) in Compartimentul de Microbiologie.

Controlul conditiilor de mediu presupune **controlul microbiologic al eficientei metodelor de curatenie si dezinfectie**: verificarea eficientei metodelor folosite, precum si introducerea de noi metode sau substante de dezinfectie in scopul eliminarii sau diminuarii la maximum a riscurilor de infectie.

Cunoasterea concentratiei bacteriene din aer in incaperi (aeromicroflora) reprezinta un indiciu asupra riscurilor de infectie.

Controlul dezinfectiei suprafetelor prin prelevari de probe de pe acestea reprezinta o apreciere a starii de curatenie din incaperile laboratorului.

2. DOMENIU DE APLICARE

Instrucţiunea se aplica în cadrul Compartimentului de Microbiologie si presupune efectuarea controlului bacteriologic al conditiilor igienico-sanitare in toate incaperile Compartimentului de Microbiologie.

3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

3.1 SR EN ISO 15190:2005 - Laboratoare medicale. Cerinte pentru securitate.

3.2 *** EA-4/10: 2002 - Accreditation for Microbiological Laboratories.

3.3 Ordinul 219/2002 – pentru aprobarea Normelor tehnice privind gestionarea deşeurilor rezultate din activităţi medicale.

3.4 Ordinul 261/2007 – pentru aprobarea Normelor tehnice privind curatarea, dezinfectia si sterilizarea in unitatile sanitare.

3.5 Norme tehnice privind controlul microbiologic pentru prevenirea infectiilor intraspitalicesti, 1982 Buletinul Ministerul Sănătăţii nr. 6 din 1982: Ordinul Ministerul Sănătăţii nr. 190/26 mai 1982 pentru stabilirea atributiilor personalului sanitar si a normelor tehnice privind prevenirea si combaterea infectiilor intraspitalicesti. Anexa 7: 93-99.

3.6 Normă tehnică din 06/02/2007 (Ministerul Sănătăţii Publice) privind curăţarea, dezinfecţia şi sterilizarea în unităţile sanitare. Publicat in Monitorul Oficial, Partea I nr. 128 din 21/02/2007.

3.7 Ordin nr. 261 din 06/02/2007 (Ministerul Sănătăţii Publice) pentru aprobarea Normelor tehnice privind curăţarea, dezinfecţia şi sterilizarea în unităţile sanitare. Publicat in Monitorul Oficial, Partea I nr. 128 din 21/02/2007.

3.8 Pânzaru Carmen, 2009 - Asigurarea calitatii in microbiologie, Curs postuniversitar, U.M.F. “Gr. T. Popa“, Iaşi, 9-17 octombrie 2009.

4. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI

4.1 Definitii

Aeromicrofloră = microorganismele prezente în mediul ambiant

4.2. Abrevieri

NTG = numarul total de germeni

SMA = Standard method agar
RODAC = Replicate Organism Detection and Counting

5. DESCRIEREA ACTIVITATII

Flora microbiană se determină posterior dezinfecţiei.

Controlul microbiologic al condiţiilor de igienă (aeromicrofloră, suprafeţe) se efectuează săptămânal în fiecare incapere din cadrul Compartimentului de Microbiologie.

5.1. MATERIALE NECESARE, ECHIPAMENTE ŞI ACCESORII

- Termostat
- Autoclav
- Hotă cu flux laminar
- Eprubete
- Anse de unica folosinta
- Pipete
- Placi cu medii de cultura pentru testat

Mediile folosite pentru insamantarea probelor sunt:

- pentru aeromicroflora: geloza nutritiva 2% cu un pH= 7,4-7,6 si geloza sange 5-10%
  pentru controlul suprafetelor: geloza nutritiva 2%, geloza sange 5%, Chapman, Levine, apa peptonata 1‰ sau placi comerciale.

5.2. RECOLTAREA PROBELOR

5.2.1. Recoltarea probelor pentru controlul aeromicroflorei (metoda sedimentării Koch)

Pentru fiecare încăpere se folosesc 3 grupe de cutii Petri cu diametrul de 9 cm, fiecare grupa cuprinzand cate o placa cu:

- geloză nutritivă 2%
- geloză sânge 5 – 10%

toate mediile proaspete, dar suficient de uscate pentru a nu avea lichid de condens pe suprafata.

Loc de expunere: o grupa de placi se expune in mijlocul incaperii de cercetat, la inaltimea unei mese (pe o masa), iar a doua, intr-un colt al incaperii, de asemenea la inaltimea unei mese (60 – 100cm de la pardosea).

Expunerea se face prin ridicarea capacelor cutiilor Petri şi aşezarea lor, cu deschiderea în jos, alături de plăcile cu mediu.

Toate cutiile cu recolte, fara a mai fi deschise, se termostateaza la 37ºC, timp de 24 de ore pentru geloza–sange, inca 24 de ore, la temperatura camerei, pentru geloza nutritiva si inca 4 zile, la temperatura camerei, pentru Sabouraud. Concomitent, se incubeaza si un cuplu de placi cu medii din acelasi lot, dar care nu au fost expuse (placi-martor).

5.2.2. Recoltarea probelor pentru controlul microbiologic al suprafetelor

Prelevarile de probe se fac de pe:

- mesele de lucru

- hota cu flux laminar

Daca anterior s-a folosit un dezinfectant, suprafetele se vor stropi cu un neutralizant.

Metoda 1.

Recoltarea probelor se realizeaza prin metoda de contact cu placi cu agar: se folosesc placi mici din plastic cu capac (diametru intern de 5,0 cm) care se pun in contact cu fiecare suprafata de testat prin presare usoara (stampilare) si se incubeaza timp de 24h la temperatura de 37^0C in conditii aerobe. Suprafata de contact a fiecarei placi este de 10 cm^2.

Dupa incubare se numara coloniile dezvoltate pe placile insamantate.

Metoda 2

Fiecare proba se recolteaza cu un tampon de vata umezit, inainte de folosire, in 1 ml apa peptonata. Cu acest tampon se sterge o suprafata avand aria egala cu a unui patrat, cu latura de 10 cm. Stergerea suprafetei se face trecand tamponul de 2-3 ori in sensuri diferite, cu rotirea lui concomitenta, pe toata suprafata delimitata de sablon.

5.3. EXAMINAREA PROBELOR

5.3.1. Pentru controlul aeromicroflorei

Prin acest control se urmareste:

- numarul de germeni pe m^3 de aer ;
- numarul de germeni hemolitici pe m^3 de aer (*S. aureus,* streptococ β-hemolitic).

Numarul de germeni se stabileste prin numararea coloniilor crescute pe suprafata gelozei simple, iar numarul germenilor hemolitici prin numararea coloniilor cu zona de hemoliza dezvoltate pe geloza sange.

Placile martor nu trebuie sa prezinte colonii.

5.3.2. Pentru controlul microbiologic al suprafetelor

La controlul dezinfectiei suprafetelor se cerceteaza:

- numarul total de germeni pe cm^2
- prezenta *E. coli*
- prezenta *S. aureus*
- prezența *Proteus*

Metoda 1

Se examineaza placile si se numara coloniile de pe fiecare tip de placa.

In eprubeta fiecarui tampon se repartizeaza cate 9 ml apa peptonata. Tamponul se lasa 10-15 min in repaus, dupa care se face o agitare puternica, pentru eliberarea germenilor de pe vata si omogenizarea lor in lichidul de suspensie.

Pentru determinarea numarului de germeni din suspensia bruta se mai face o dilutie 1/10 in apa peptonata. Atat din suspensia bruta cat si din dilutia zecimala se vor incorpora cate 1 ml in geloza 2%, topita si racita la 45-50° Celsius, turnata in cutii Petri. Dupa 48 de ore de incubatie, se numara coloniile dezvoltate pe cele doua placi ale fiecarei probe (suspensie bruta si dilutie zecimala). Tinand cont ca 1 ml din suspensia bruta insamantata contine a zecea parte din germenii colectati de pe o suprafata de 100 cm^2, media coloniilor dezvoltate pe ambele placi se reporteaza la 1 cm^2 de suprafata dupa formula urmatoare:

[(Suspensia bruta x 10) + dilutia zecimala x 100] / 2 x suprafata sablonului = germeni / cm^2

Prezenta bacilului coli enteropatogen se urmareste prin insamantarea a 1 ml din suspensia 1/10 pe Levine incubat timp de 48 de ore la 37° C. Pentru depistarea stafilococului patogen se amesteca 2-3 ml din suspensia microbiana cu o cantitate egala de mediu de imbogatire hiperclorurat lichid, iar dupa 24 de ore de termostatare se face trecerea pe geloza sange 5% si mediu solid Chapman. Coloniile pozitive si hemolitice vor fi cercetate pentru producerea coagulazei.

5.4. INTERPRETAREA REZULTATELOR:

5.4.1. Pentru controlul aeromicroflorei

Raportarea la m^3 de aer se face prin aplicarea formulei lui Omelianski:

$$\text{Nr. germeni / } m^3 \text{ aer} = \frac{N \times 10.000}{S \times K}$$

unde:

N = numărul de colonii pe suprafata placii Petri,
S= suprafaţa mediului in cm^2,
K=coeficientul timpului de expunere (pt. 10 min. K=2).

Limite maxime admisibile:

Limite maxime admisibile: Număr total de germeni (NTG)/m^3 aer	
La 10-15 min. după efectuarea curăţeniei si dezinfectiei	În timpul lucrului
500	1000

Nu se admite prezenta florei patogene (*S. aureus,* streptococ β-hemolitic).

5.4.2. Pentru controlul microbiologic al suprafetelor

Interpretarea rezultatelor se realizeaza conform instructiunilor producatorului. Evaluarea conditiilor igienice se realizeaza conform tabelului:

Evaluarea conditiilor igienico-sanitare:

Numar colonii /placa	Evaluare
0 - 9	Negativ/fara contaminare
10 - 29	Contaminare usoara
30 - 99	Contaminare medie
≥ 100	Contaminare severa

6. RESPONSABILITATI

6.1. Şeful de laborator

- aprobă şi alocă resurse pentru desfasurarea activitatii

6.2. Personalul cu studii superioare

- examineaza placile şi consemnează rezultatele

6.3. Asistentul de laborator

- pregateste mediile de cultura
- realizeaza recoltarea probelor

6.4. Personalul de ingrijire

- execută şi întreţine curăţenia în laborator;
- colectează şi depozitează reziduurile de probe şi deşeurile auxiliare.

7. INREGISTRARI

7.1. Fisa control aeromicroflora, cod F-PO-M-05-02, rev. 0
7.2. Fisa control suprafete, cod F-PO-M-05-01, rev. 0

8. ANEXE

8.1. **ANEXA 1:** Model fisa control aeromicroflora
8.2. **ANEXA 2:** Model fisa control suprafete

LABORATORUL DE ANALIZE MEDICALE

Fisa de control intern al aeromicroflorei

Data prelevarii: ……. **Semnatura:……..**

Mediile de cultura utilizate :

Mediul de cultura	Nr. lot	Timp expunere	Temperatura de incubare	Timp de incubare
Geloza simpla		10 min	37ºC	48 h
Geloza sange		10 min	37ºC	24 h

Rezultate cantitative:

Locatia	Punct de prelevare		UFC (geloza simpla)	UFC (geloza sange)	Punct de prelevare		UFC (geloza simpla)	UFC (geloza sange)
Bacteriologie	**1**	Masa de lucru 1 camera 1			**6**	Hota cu flux laminar camera 3		
	2	Masa de lucru 2 camera 1			**7**	Masa de lucru 1 camera 4		
	3	Masa de lucru 1 camera 2			**8**	Masa de lucru 2 camera 4		
	4	Masa de lucru 2 camera 2			**9**	Masa de lucru 1 camera 5		
	5	Masa de lucru camera 3			**10**	Masa de lucru 2 camera 5		

$$\text{Nr. germeni / cm}^2 = \frac{\text{N x 10.000}}{\text{S x K}} =$$

N = numar colonii pe suprafata placii Petri
S = suprafata mediului in cm^2 ($3{,}14x\ 4{,}5^2=63{,}5cm^2$)
K = coeficientul timpului de expunere (10 minute = 2)

Rezultate calitative:

Germeni	Punct de prelevare									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Staphylococcus aureus										
Streptococ β-hemolitic										

Fisa de control intern al aeromicroflorei

LABORATORUL DE ANALIZE MEDICALE

Data prelevarii: ……. **Semnatura:……..**

Mediile de cultura utilizate :

Mediul de cultura	Nr. lot	Timp expunere	Temperatura de incubare	Timp de incubare
Geloza simpla		10 min	37ºC	48 h
Geloza sange		10 min	37ºC	24 h

Rezultate cantitative:

Locatia		Punct de prelevare	UFC (geloza simpla)	UFC (geloza sange)	Locatia		Punct de prelevare	UFC (geloza simpla)	UFC (geloza sange)
BIOCHIMIE	1	Masa de lucru 1 camera 1			HEMATOLOGIE	11	Masa de lucru 1 camera 1		
	2	Masa de lucru 2 camera 1				12	Masa de lucru 2 camera 1		
	3	Masa de lucru 1 camera 2				13	Masa de lucru 1 camera 2		
	4	Masa de lucru 2 camera 2				14	Masa de lucru 2 camera 2		
	5	Masa de lucru 1 camera 3				15	Masa de lucru 1 camera 3		
	6	Masa de lucru 2 camera 3				16	Masa de lucru 2 camera 3		
	7	Masa de lucru 1 camera 4			IMUNO-LOGIE	17	Masa de lucru 1 camera 1		
	8	Masa de lucru 2 camera 4				18	Masa de lucru 2 camera 1		
	9	Masa de lucru 1 camera 5			CAMERA PRIMIRE PROBE	19	Masa de lucru 1 camera 1		
	10	Masa de lucru 2 camera 5				20	Masa de lucru 2 camera 1		

$$\text{Nr. germeni / cm}^2 = \frac{N \times 10.000}{S \times K} =$$

N = numar colonii pe suprafata placii Petri
S = suprafata mediului in cm^2 ($3,14 \times 4,5^2 = 63,5 cm^2$)
K = coeficientul timpului de expunere (10 minute = 2)

Rezultate calitative:

Germeni	Punct de prelevare																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Staphylococcus aureus																				
Streptococ β-hemolitic																				

LABORATORUL DE ANALIZE MEDICALE

Fisa de control intern al suprafetelor

Data prelevarii: ……. **Semnatura:……..**

Mediile de cultura utilizate :

Mediul de cultura	Produs / Nr. lot / Data expirarii	Temperatura de incubare	Timp de incubare
SMA (Testare numar total germeni)	Produs Food Stamp TC Lot XXX Exp. XX.XX.2010	37ºC	48 h
DESO (Testare coliforme)	Produs Food Stamp CF Lot XXX Exp. XX.XX.2010	37ºC	48 h
TGSE (Testare *Staphylococcus aureus*)	Produs Food Stamp SA Lot XXX Exp. XX.XX.2010	37ºC	48 h

Locatia	Punct de prelevare			
BACTERIOLOGIE	**1**	Masa de lucru 1 camera 1	**5**	Masa de lucru camera 3
	2	Masa de lucru 2 camera 1	**6**	Hota cu flux laminar camera 3
	3	Masa de lucru 1 camera 2	**7**	Masa de lucru camera 4
	4	Masa de lucru 2 camera 2	**8**	Masa de lucru camera 5

Rezultate calitative:

Germeni	Punct de prelevare							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
SMA (numar total germeni)								
DESO (coliforme)								
TGSE (*Staphylococcus aureus*)								

Evaluarea conditiilor igienico-sanitare :

Numar colonii /placa	Evaluare
0 - 9	**Negativ/fara contaminare**
10 - 29	**Contaminare usoara**
30 - 99	**Contaminare medie**
Peste 100	**Contaminare severa**

LABORATORUL DE ANALIZE MEDICALE

Fisa de control intern al suprafetelor

Data prelevarii: ……. **Semnatura:……..**

Mediile de cultura utilizate :

Mediul de cultura	Produs / Nr. lot / Data expirarii	Temperatura de incubare	Timp de incubare
SMA (Testare numar total germeni)	Produs Food Stamp TC Lot XXX Exp. XX.XX.2010	37ºC	48 h
DESO (Testare coliforme)	Produs Food Stamp CF Lot XXX Exp. XX.XX.2010	37ºC	48 h
TGSE (Testare *Staphylococcus aureus*)	Produs Food Stamp SA Lot XXX Exp. XX.XX.2010	37ºC	48 h

Locatia	Punct de prelevare		Locatia	Punct de prelevare	
BIOCHIMIE	**1**	Masa de lucru camera 1	**HEMATOLOGIE**	**6**	Masa de lucru camera 1
	2	Masa de lucru camera 2		**7**	Masa de lucru camera 2
	3	Masa de lucru camera 3		**8**	Masa de lucru camera 3
	4	Masa de lucru camera 4	**IMUNOLOGIE**	**9**	Masa de lucru camera 1
	5	Masa de lucru camera 5	**CAMERA PRIMIRE PROBE**	**10**	Masa de lucru camera 1

Rezultate calitative:

Germeni	Punct de prelevare									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
SMA (numar total germeni)										
DESO (coliforme)										
TGSE (*Staphylococcus aureus*)										

Evaluarea conditiilor igienico-sanitare :

Numar colonii /placa	Evaluare
0 - 9	**Negativ/fara contaminare**
10 - 29	**Contaminare usoara**
30 - 99	**Contaminare medie**
Peste 100	**Contaminare severa**